

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19510119
 研究課題名（和文） 凍結乾燥可能なDNA複合体の調製と固形製剤による
 新規遺伝子導入システムの創製
 研究課題名（英文） Preparation of the lyophilizable DNA complexes and novel
 therapeutic system with the freeze-dried solid complexes

研究代表者

小山 義之 (KOYAMA YOSHIYUKI)
 大妻女子大学・家政学部・教授
 研究者番号：00162090

研究成果の概要：

ヒアルロン酸でコートしたDNA/ポリカチオン複合体は、凍結乾燥後も活性が維持された。そこで、極低濃度で調製した微小な複合体を凍結乾燥し、少量の水を加えることで、これまで不可能とされていた極微小なDNA複合体超微粒子の高濃度分散液の調製に成功した。

GM-CSF遺伝子をコードしたプラスミドを用いて極微小な複合体を調製し、担癌マウスの腫瘍局所内に投与したところ、ほとんどのマウスで腫瘍の完全消失が見られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,100,000	630,000	2,730,000
20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ・ ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：核酸、ナノバイオ、バイオテクノロジー、遺伝子治療、凍結乾燥

1. 研究開始当初の背景

DNAとポリカチオンとの複合体が、非ウイルス型ベクターとして広く研究されてきた。しかし、これらは培養細胞においては高い発現効率を認め、in vivoにおける発現は極めて低い。その主な原因として（1）生体組織との非特異的な相互作用、（2）複合体の大きなサイズがあげられる。

我々はアニオン性PEG誘導体（PEG-C）と天然成分であるヒアルロン酸がDNA/ポリカチオン複合体をコートするという特殊な機能を持つことを見出した。DNA/ポリカチオン複合体にこれらのポリアニオンを加えて表面をコートし、表面電位をマイナスに再

荷電することで、血球細胞やタンパクとの相互作用を効果的に抑制することに成功した。（2）のサイズに関しては、有効な解決方法が無く、世界的に研究が息詰まった状態にあった。

また、DNA/ポリカチオン複合体は分散が不安定で、調製後安定に保存する方法がなかった。一方我々は、ヒアルロン酸で被覆したDNA複合体は、凍結乾燥・再水和しても凝集せず、その活性が維持されることを見出し、報告した。

2. 研究の目的

本システムは、通常のプラスミド/ポリカ

チオン複合体にさらにポリアニオンを加えた三元複合体であることを特徴とする。生体成分との副作用がほとんど無いこと、および凍結乾燥出来るという特長を利用して、ヒトへの臨床応用可能な、治癒効果の高い非ウイルス型の遺伝子治療システムを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

より発現効率の高い製剤を設計するために、始めに一般のDNA複合体が凍結乾燥で失活するメカニズムを解明する。

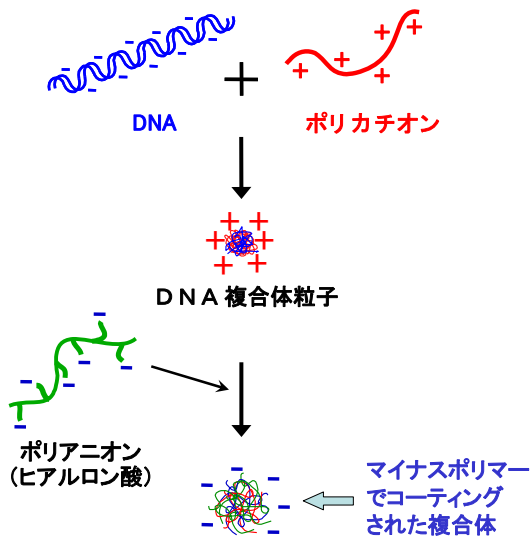
続いて、凍結乾燥、保存のための最適高分子素材、混合条件の確立、リポーター遺伝子プラスミド複合体を用いた効率の高い癌種の選定、小動物モデルにおける治癒実験を行い、これらを製剤設計にフィードバックしながら最適な遺伝子治療システムの構築を行う。

4. 研究成果

(1) 概要

従来のDNA/カチオン性高分子(脂質)複合体は表面がプラスに帯電しているため血中の細胞やタンパクと相互作用し、好ましくない生理反応を引き起こす。複合体表面のアニオン化によって副作用の問題は大きく改善された。しかし、残るもう一つの問題点である複合体のサイズについては、複合体の血管内輸送、血管からの漏出、標的組織内での拡散において非常に重要な問題であるにもかかわらず、これまで解決法が無かった。

本研究において、DNA複合体を凍結乾燥・再水和することによって、これらの問題を解決し、極微細なDNA複合体を調製する手法を見出し、生体内での非ウイルスベクターによる外来遺伝子の高発現を初めて達成した。以下その概要を具体的に述べる。



(2) 低濃度における極微粒子の調製

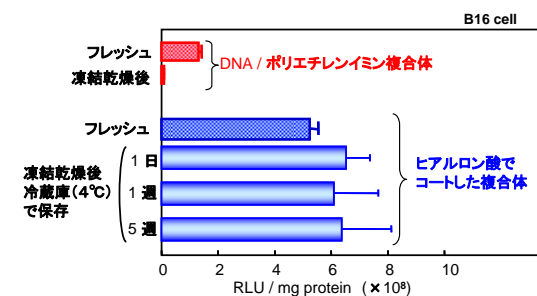
プラスミドDNAは、*in vivo* で用いる高濃度 ($[DNA] > 200 \mu\text{g/ml}$) の条件では急速に凝集する。我々は、DNAに予めヒアルロン酸を加えてからポリカチオンを加えることで凝集が抑えられ、比較的微小な粒子が得られることを見出した。これらの微小複合体はマウスに腫瘍局所内投与後、比較的高い遺伝子発現を示し、その高い有効性が確認された。

しかし、高濃度 ($[DNA] > 200 \mu\text{g/ml}$) では、プラスミドとDNAは初めから大きな粒子を形成し、凝集を防ぐだけでは充分小さな粒子は得られず、高い治療効果を導くには更なる粒子の微小化が必要であった。一方、極低濃度 ($[DNA] < 10 \mu\text{g/ml}$) でDNAをポリカチオンと混合すると極微小の粒子が得られる。ところが、それを凝集させずに治療に有効な濃度まで濃縮する手法がなかった。DNA/ポリカチオン複合体は限外ろ過などによっても容易に凝集してしまう。また、凍結・融解や凍結乾燥すると、遺伝子導入活性が大きく低下する。

(3) 凍結乾燥による濃縮

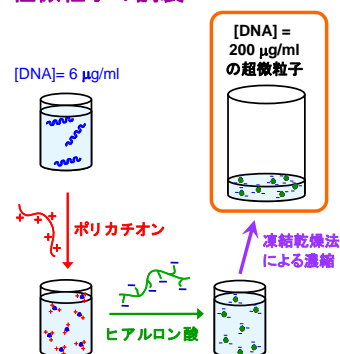
一方、DNA複合体にヒアルロン酸を加えることで、凍結乾燥・再水和してもそのサイズと活性が保たれることを最近見出した。

ヒアルロン酸でコートしたDNA複合体は凍結乾燥後も遺伝子導入活性が維持される



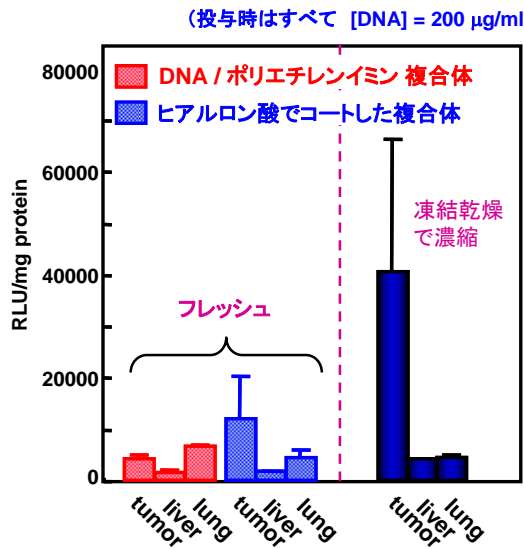
そして、ポリアニオンで被覆した極微小な三元複合体粒子を高希釈下で調製したのち、凍結乾燥・再水和の過程で凝集させずに濃縮し、多くの研究者の夢であった *in vivo* に適応可能な高濃度の微小なプラスミド複合体粒子を得ることに初めて成功した。

極微粒子の調製



レポーター遺伝子を用いて調製した複合体微粒子を担癌マウスに尾静脈内投与したところ、腫瘍組織内において非常に高い遺伝子発現を示すことを確認した。

このように、DNA複合体の表面電荷をマイナスにし、さらに複合体のサイズを 100 nm 以下にすることによって、非ウイルス型ベクターによる生体内での高発現を初めて実現した。



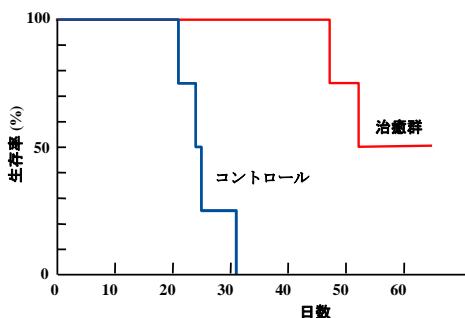
また、前ページの図にあるように、ここで得られた凍結乾燥複合体は、1ヶ月以上冷蔵保存しても、フレッシュなものと同等の高い遺伝子発現効率を示した。

(4) 高い治癒効果

免疫活性化因子 GM-CSF の遺伝子をコードしたプラスミドを用いてこのような三元微小複合体を調製し、担癌マウスにおける治療効果を調べてみた。

(1) 腹腔内に卵巣癌OVHM細胞を移植したマウスに、プラスミド 100 µg を含む複合体を一日おきに5回腹腔内投与したところ、コントロール群が20日前後で死亡したのに対して、治療遺伝子を腹腔内投与したものは50日以上生存し、腹水の貯留も見られなかった。

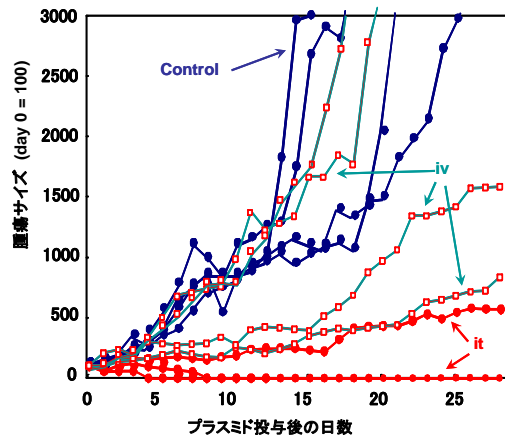
腹腔転移卵巣腫瘍に対する治癒効果: 顕著な生存日数の延長



(2) 皮下にメラノーマB16細胞を移植したマウスに、プラスミド 100 µg を含む複合体を一日おきに5回静脈内投与したところ、4匹中2匹のマウスにおいて顕著な腫瘍の増大抑制が認められた。

(3) 同様に皮下にメラノーマを移植したマウスの腫瘍組織内に、プラスミド 100 µg を含む複合体を一日おきに5回局所内投与したところ、ほとんどのマウスにおいて腫瘍は完全に消失した。

固形腫瘍に対する治癒効果



このように、本システムは高い治癒効果を持った初めての非ウイルス型の遺伝子導入製剤であり、現在問題となっている様々な障壁に対するブレイク・スルーとなることが期待されるものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- Efficient in vivo Gene Transfection by Stable DNA/PEI Complexes Coated by Hyaluronic Acid, T. Ito, N. I.-Tanaka, Y. Koyama, J. Drug Targeting, 16, 276-281 (2008) 査読有
- Highly efficient in vivo gene transfection by plasmid/PEI complexes coated by anionic PEG derivatives bearing carboxyl groups and RGD peptide, M. Sakae, T. Ito, C. Yoshihara, N. I.-Tanaka, H. Yanagie, M. Eriguchi, Y. Koyama, Biomedicine & Pharmacotherapy, 62, 448-453 (2008) 査読有
- In Vitro Gene Delivery by pDNA/Chitosan Complexes Coated with Anionic PEG Derivatives that Have a Sugar Side Chain, M. Hashimoto, Y. Koyama, T. Sato, Chem. Lett. 37 266-267 (2008) 査読有

4. Preparation of Fine DNA Particles and High Level Tumor-targeted In Vivo Gene Expression after Intravenous Injection, T. Ito, M. Otsuka, Y. Koyama, Molecular Therapy, 16, S366 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計11件)

レーザーラマン顕微鏡による DNA/ポリカチオン/ヒアルロン酸三元複合体の表面構造解析, 伊藤智子, 小山義之, 大塚誠, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008 東京 (2008.11)

Preparation of Very Small Plasmid Complex Particles and Their Therapeutic Effects against Cancer, Y. Koyama, C. Yoshihara, K. Hamada, T. Ito, Gordon Research Conference, Ventura (CA) (2009.1)

Improve of transcription-and transfection efficiency by synthetic polyampholytes, C. Yoshihara, T. Ito, C.-Y. Shew, Y. Koyama, Gordon Research Conference, Ventura (CA) (2009.1)

Analysis of the surface structure of DNA/polycation/hyaluronic acid ternary complex by Raman microscopy, T. Ito, Y. Koyama, M. Otsuka, Gordon Research Conference, Ventura (CA) (2009.1)

極微細なプラスミド複合体の調製とその治療効果, 小山義之, 濱田雄行, 伊藤智子, 芳原智恵子, アンチセンスシンポジウム, 岐阜 (2009.11)

DNA/ポリカチオン/両性イオン高分子三元複合体の調製条件と転写活性との相関, 芳原智恵子, C.-Y. Shew, 小山義之, アンチセンスシンポジウム, 岐阜 (2009.11)

Improve of transcription- and transfection-efficiency by synthetic polyampholytes, C. Yoshihara, T. Ito, C.-Y. Shew, Y. Koyama, 国際核酸シンポジウム, 京都 (2008.9)

DNA/ポリカチオン/ポリアニオン/両性イオン型高分子四元複合体による高発現遺伝子導入システム, 芳原智恵子, 伊藤智子, 小山義之, 第24回 DDS 学会, 東京 (2008.6)

極微細なプラスミド複合体の調製とその治療効果, 小山義之, 濱田雄行, 伊藤智子, 芳原智恵子, 第24回 DDS 学会, 東京 (2008.6)

Preparation of Fine DNA Particles and High Level Tumor-targeted In Vivo Gene Expression after Intravenous Injection, T. Ito, M. Otsuka, Y. Koyama, アメリカ遺伝子治療学会, Boston (MA) (2008.5)

合成両イオン型高分子による転写・翻訳促進機構, 芳原智恵子, 伊藤智子, 小山義之, 第9回 遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム, 大阪 (2008.5)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 義之 (KOYAMA YOSHIYUKI)
大妻女子大学・家政学部・教授
研究者番号: 00162090